

026418

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 29 935.8
Anmeldetag: 04. Juli 2002
Anmelder/Inhaber: Carl Zeiss Jena GmbH,
Jena/DE
Bezeichnung: Einrichtung zur Einkopplung von Licht in ein
Mikroskop
IPC: G 02 B 21/06

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 27. Februar 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Waasmaier

Einrichtung zur Einkopplung von Licht in ein Mikroskop

Die Erfindung betrifft eine Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Auflichtstrahlengang eines Mikroskops. Sie ist insbesondere anwendbar bei der Realisierung des bekannten Mikroskopierverfahrens Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF), bei welchem Licht unter einem Winkel in das zu untersuchende Präparat eingestrahlt wird, welcher größer als der Winkel der Totalreflexion an der Grenzschicht Deckglas/Präparat ist. Durch die Totalreflexion wird das Präparat mit einem evaneszenten Feld beleuchtet, welches nur eine Eindringtiefe von 100-200 nm hat. Damit kann es nur in diesem Bereich zu Fluoreszenz-Anregung kommen und bei der Detektion des Fluoreszenzsignals lässt sich eine Verbesserung des Signal-zu-Rauschverhältnisses gegenüber herkömmlichen Verfahren erzielen.

Dies dient zum Beispiel zur Untersuchung von intra- und interzellulären Transportvorgängen, an Zellmembranen etc., die sich direkt auf der Deckglasfläche befinden.

Die ersten Experimente wurden von Daniel Axelrod et al. beschrieben:

- Stout & Axelrod: Evanescent field excitation of fluorescence by epi-illumination microscopy, Dez. 1989, Applied Optics, Vol. 28, No. 24, S. 5237
- Sund, Swanson & Axelrod: Cell Membrane Orientation Visualized by Polarized Total Internal Reflection Fluorescence, Oct. 1999, Biophysical Journal, Vol. 77

Weitere Literaturnachweise u.a.:

- Zenisek, Steyer & Almers: Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones, Aug. 2000, Nature, Vol. 406

Grundsätzlich gibt es 2 Möglichkeiten TIRF Mikroskopie durchzuführen: im Durchlicht und im Auflicht.

a) Bei der Durchlichtvariante muß der Kondensor ausgetauscht werden gegen ein Lasereinkopplungs-Prisma-System wie es z.B. aus DE 199 23 563 A1 vom 7.12.2000 bekannt ist. Diese Lösung weist eine Reihe von Nachteilen auf, sie ist für Inverse Mikroskope ungeeignet, da der dort benötigte Platz über dem Präparat durch das Prisma verdeckt wird, und damit kein Zugang zum Präparat mehr möglich ist, wie er für viele Experimente benötigt wird.

b) Die Auflichtvariante erfordert einerseits ein Objektiv mit ausreichend großer numerischer Apertur und andererseits eine Einkopplung des Lasers durch dieses Objektiv.

Die Einkopplung des Lasers erfolgt bei bekannten Lösungen durch den Epi-Fluoreszenz Strahlenengang und setzt den Austausch der Standard Auflichtbeleuchtung durch eine spezielle Version voraus oder es wird ein zur Standardauflichtbeleuchtung parallelen Strahlengang für eine TIRF-

Lasereinkopplung verwendet. Eine solche Lösung wird von der Firma T.I.L.L. Photonics unter der Bezeichnung TILL-TIRF Modul hergestellt. Der Austausch der kompletten Auflichtbeleuchtung macht die Systeme teuer und inflexibel.

Aufgabe der Erfindung ist die Beseitigung der Nachteile des Standes der Technik und die Angabe einer einfachen und vielseitig anwendbaren Lichteinkopplung in den Auflichtstrahlengang eines Mikroskops.

Diese Aufgabe wird bei einer Einrichtung zur Einkopplung von Licht in ein Mikroskop durch die Merkmale des 1. Anspruchs gelöst. Bevorzugte Weiterentwicklungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Lösung liegt darin, dass ein an den meisten Mikroskopen standardmäßig vorhandener und an sich zur Aufnahme von speziellen Einrichtungen zur Kontrastierung (z. B. DIC-Schieber) vorgesehener Zugang zur Einkopplung des Lichtes einer zweiten Lichtquelle, z. B. eines Lasers genutzt werden kann, ohne dass weitere Veränderungen am Beleuchtungsstrahlengang vorgenommen werden müssen.

Durch die vorgesehene Neigungsmöglichkeit für den eingekoppelten Lichtstrahl gegen die optische Achse lässt sich in besonders einfacher Weise der Lichtstrahl auf den Randbereich der Austrittspupille eines hochaperturigen Objektiv richten und so das TIRF-Verfahren realisieren. Die voreingestellte Basisneigung des eingekoppelten Strahls gegen die optische Achse vereinfacht die zur Durchführung des TIRF-Verfahrens notwendige Justage in besonderer Art und Weise.

In analoger Art lässt sich die Erfindung bei Einkopplung des Lichtes parallel zur optischen Achse auch zur Beleuchtung des Präparates mit einer Laserlichtquelle benutzen.

Die Erfindung wird im Folgenden an Hand der Ausführungsbeispiele in den Figuren 1 bis 3 näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Ansicht eines Mikroskops mit der erfindungsgemäßen Lichteinkopplung

Fig. 2 den optischen Strahlengang der Lichteinkopplung

Fig. 3 eine schematische Ansicht der Realisierung der Erfindung in Form eines Mikroskopschiebers

In Fig. 1 ist ein Mikroskop 1 (hier vom inversen Typ) schematisch dargestellt, welches eine Standardauflichtbeleuchtung 2 aufweist. Mittels eines erfindungsgemäßen Schiebers 3 wird Licht einer zweiten Lichtquelle (i. A. eines Lasers) über eine Lichtleitfaser 4 in den Auflichtstrahlengang eingekoppelt.

In Fig. 2 ist der optische Strahlengang eines Mikroskops mit der erfindungsgemäßen Lichteinkopplung abgebildet. Eine Lichtquelle 5, z. B. eine Halogenlampe wird über einen Kollimator 6 und eine

Relaylinse 7 in die Leuchtfeldblendenebene 8 abgebildet. Diese wird über die Auflichttubuslinse 9 und das Objektiv 10 in die Objektebene 11 abgebildet. Dem Objektiv 10 ist eine Objektivausgangspupille 12 zugeordnet. Die Elemente Kollimator 6, Relaylinse 7 und Auflichttubuslinse 9 bilden zusammen die Standard-Auflichtbeleuchtung 13. In der Ebene der Leuchtfeldblende 8 ist ein reflektierendes Element 14 angeordnet, welches das von einer Lichtleitfaser 15 kommende Licht vorzugsweise eines Lasers in den Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskops einkoppelt. Ein achromatischer oder asphärischer Kollimator 16 fokussiert dabei das aus der Faser 15 divergent austretende Lichtbündel über die Tubuslinse 9 in die Austrittspupille 12 des Objektivs 10. Die Beleuchtungssachse 17 des kollinierten Laserlichtes ist gegenüber der Beleuchtungssachse 18 des Mikroskops um einen bestimmten Basiswinkel 19 geneigt. Diese Neigung bewirkt, dass der aufgeweitete Laserstrahl durch die Auflichttubuslinse 9 in den Randbereich der Objektivaustrittspupille 12 fokussiert wird. Dieser Neigungswinkel 19 ist von den jeweiligen optischen Verhältnissen (optische Länge des Strahlengangs, Brennweite der Tubuslinse) abhängig und beträgt beispielsweise beim Mikroskop „Axiovert 200“ der Anmelderin ca. 2° . Dieser voreingestellte Neigungswinkel 19 hat den Vorteil, daß die laterale Feinjustierung des Laserfokus in die Austrittspupille des Objektivs sehr einfach über eine geringfügige Kippbewegung der Beleuchtungssache von Kollimatoroptik 16 und Faser 15 erreicht werden kann. Bei Bedarf kann die Fokusslage des Laserspots noch über eine geringfügige Fokussierung der Kollimatoroptik 16 erreicht werden.

Das reflektierende Element 14 ist als Farbteiler ausgeführt, dessen Reflexionseigenschaften so gewählt sind, dass das Laserlicht optimal reflektiert wird, das Licht der Standardlichtquelle 5 aber nahezu ungehindert hindurch gelassen wird.

Der Farbteiler 14, der mittig auf der optischen Achse 20 der Auflichtbeleuchtung 13 angeordnet ist, wird auf diese Weise von dem Lichtbündel aus der Faser 17 zentral getroffen. Die eingestellte Basisneigung bewirkt, daß der Farbteiler 14 einen kleinen Durchmesser behalten kann, weil beim Kippen der Einheit aus Kollimator 16 und Faser 15 zur Winkeleinstellung praktisch kein seitlicher Versatz auftritt. Zur Feinjustierung des Winkels sind dann lediglich Kippungen im Minutenbereich notwendig, diese führen dann zu keiner Vignettierung.

Fig. 3 zeigt die erfindungsgemäße Lichteinkopplung als Mikroskopschieber 21, in welchem Faseraufnahme 22, Kollimator 16 und Umlenkarbteiler 14 montiert und ausgerichtet sind. Der Kollimator 16 mit der Faseraufnahme 22 kann, zusammengefasst in einer Einheit 25, zusätzlich zur Basisneigung 19 für die Feinjustierung und Winkelanpassung für das TIRF-Verfahren z. B. über ein Festkörpergelenk 23 mit Hilfe einer Mikrometerschraube 24 (schematisch dargestellt) gekippt werden.

Die Realisierung der Erfindung ist nicht an das dargestellte Ausführungsbeispiel gebunden, so kann z. B. die Basisneigung 19 auch über eine voreingestellte Verkippung des Farbteilers 14 realisiert werden.

Soll die Lichteinkopplung lediglich als Einkopplung einer zweiten (Laser-)Lichtquelle dienen ist ein Basiswinkel 19 von 0° zu wählen.

Patentansprüche

- 1) Einrichtung zur Einkopplung von Licht zur Beleuchtung eines Präparats in den Strahlengang eines Mikroskops, welches ein Objektiv und eine Tubuslinse sowie eine Auflichtbeleuchtungseinrichtung aufweist, welche aus einer Lichtquelle und einem Kondensor besteht, wobei der Kondensor die Lichtquelle in ein Leuchtfeldblendenebene abbildet und dabei eine optischen Achse definiert, gekennzeichnet dadurch, dass vorzugsweise in der Nähe der Leuchtfeldblendenebene ein mindestens teilreflektierendes Element vorgesehen ist, welches Licht einer zweiten Lichtquelle unter einem vorzugsweise geringem Winkel zur optischen Achse in den Strahlengang reflektiert.
- 2) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass die zweite Lichtquelle ein Laser ist.
- 3) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, dass der Winkel, unter welchem das Licht der zweiten Lichtquelle in den Strahlengang reflektiert wird, einstellbar ist.
- 4) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 1, 2 oder 3, gekennzeichnet dadurch, dass das mindestens teilreflektierende Element das Licht der zweiten Lichtquelle parallel zur optischen Achse in den Strahlengang reflektiert.
- 5) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, gekennzeichnet dadurch, dass das mindestens teilreflektierende Element vorzugsweise unter einem Winkel von 45° zur optischen Achse angeordnet ist.
- 6) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach einem der vorigen Ansprüche, gekennzeichnet dadurch, dass eine Lichtleitfaser vorgesehen ist, welche so gehaltert ist, dass das mindestens teilreflektierende Element vorzugsweise mittels eines optischen Abbildungssystems mit dem Licht der zweiten Lichtquelle beaufschlagt wird.
- 7) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 6, gekennzeichnet dadurch, dass die Halterung der Lichtleitfaser eine Einrichtung zur Einstellung der Neigung aufweist.
- 8) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 7, gekennzeichnet dadurch, dass die Halterung der Lichtleitfaser eine Basisneigung gegen die optische Achse aufweist.
- 9) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 6, 7 oder 8, gekennzeichnet dadurch, dass das optische Abbildungssystem fokussierbar ist.
- 10) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 6, 7, 8 oder 9, gekennzeichnet dadurch, dass das mindestens teilreflektierende E-

lement, die Halterung der Lichtleitfaser und das optische Abbildungssystem in einer mechanischen Einheit zusammengefasst sind.

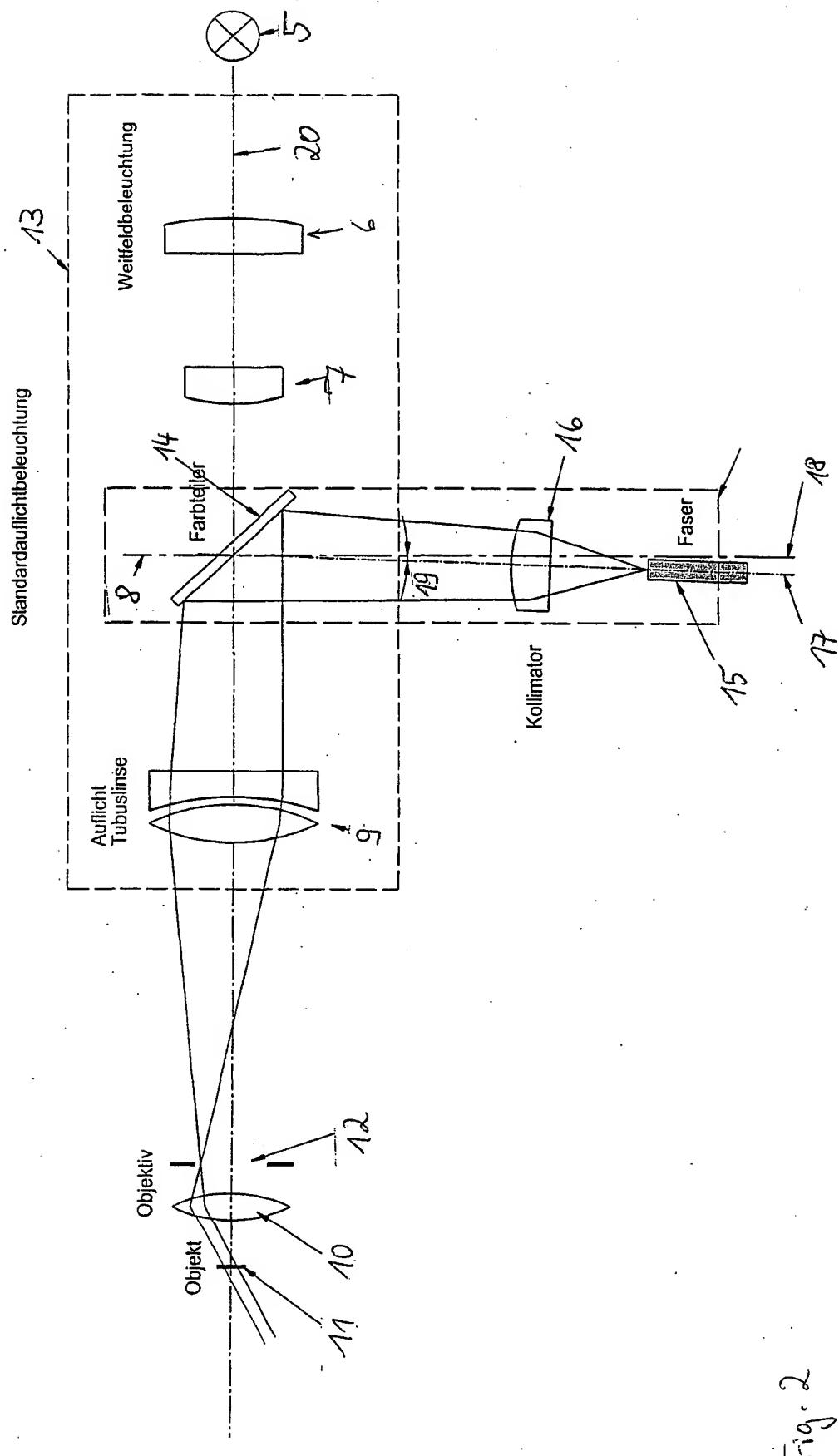
- 11) Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, die mechanische Einheit als Schieber ausgeführt ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Einrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops. Dabei wird in der Leuchtfeldblendenebene durch eine als Schieber ausgeführte Lichtleitfaser-Einkopplung Laserlicht auf das Präparat gerichtet. Die Erfindung ist insbesondere für das TIRF-Verfahren geeignet.

Fig. 2

7613



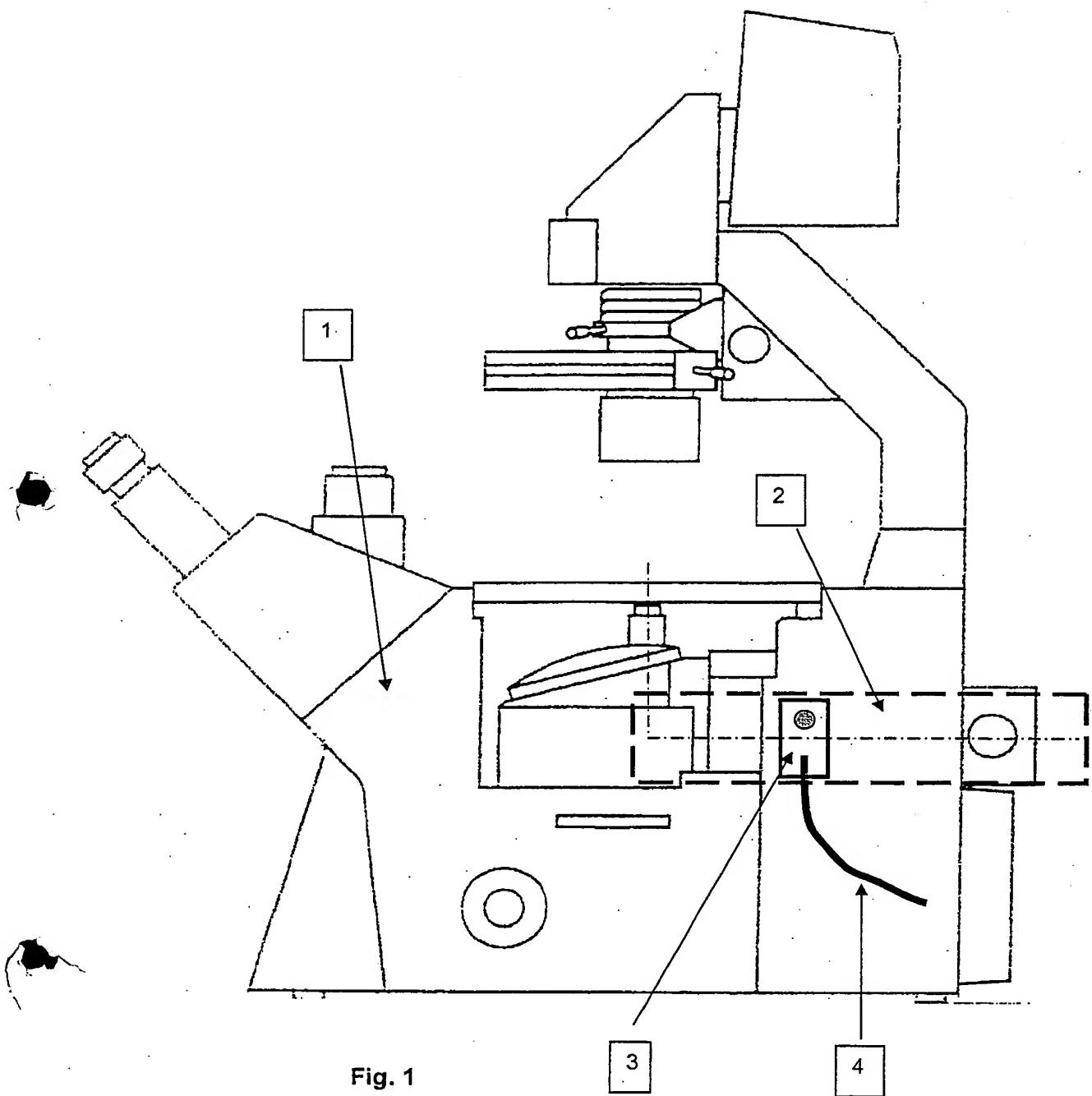


Fig. 1

7613

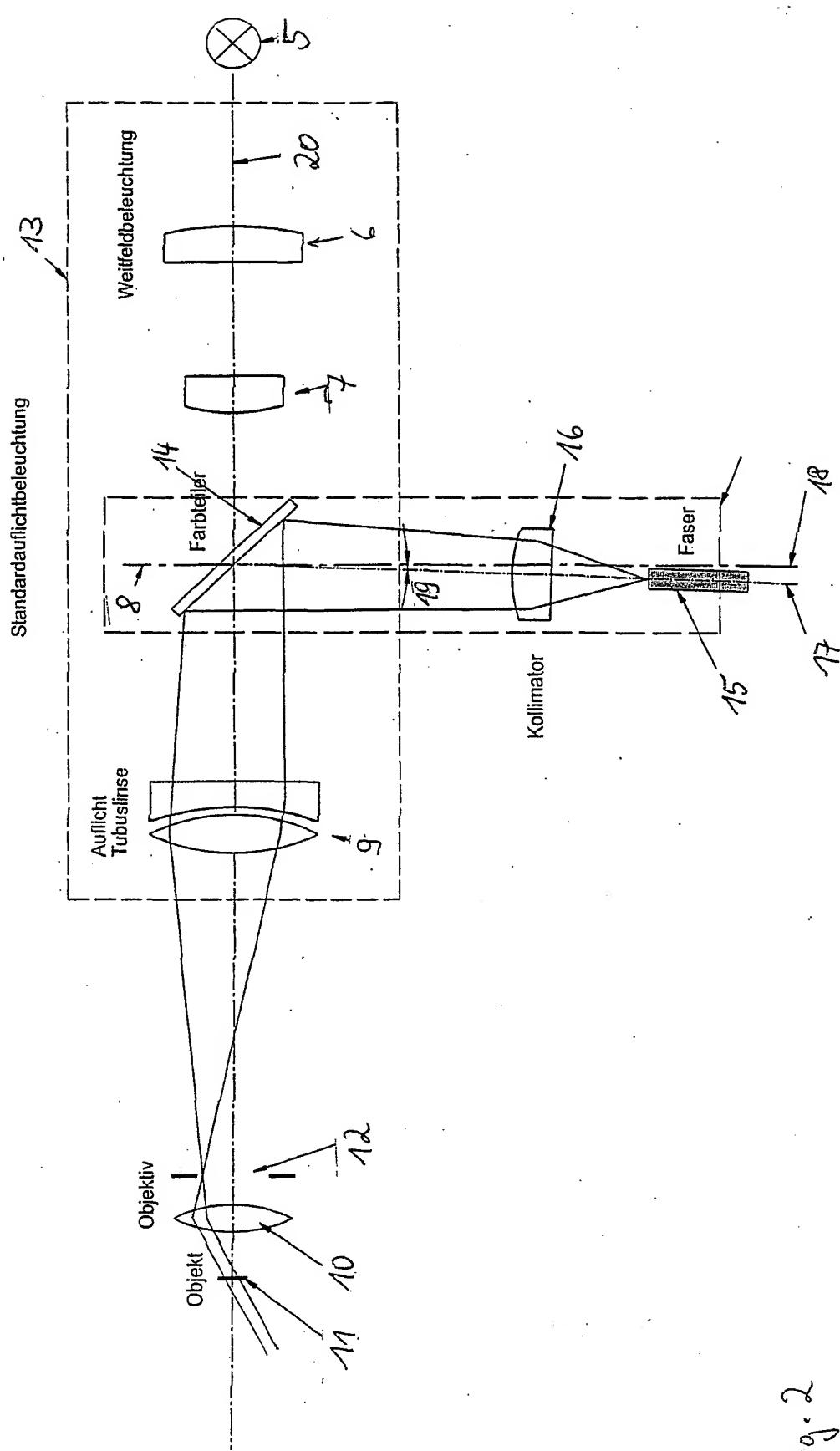


Fig. 2

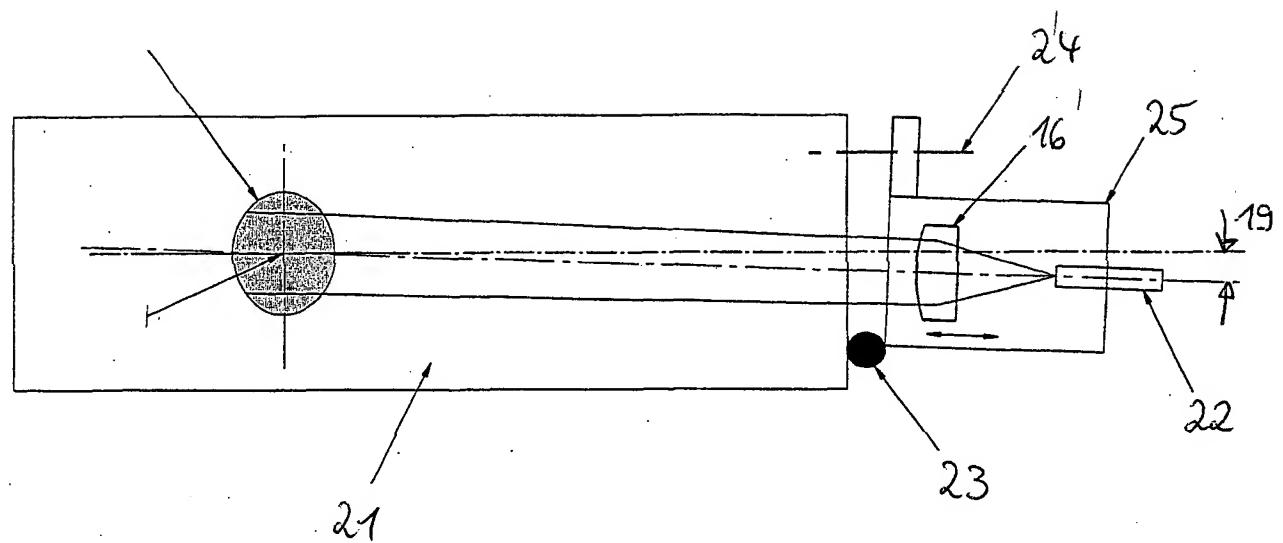


Fig. 3